

THESIS

MÜNICH

1967

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DEN
ENERGIESTOFFWECHSEL
DER
KÜHLKONSERVIERTEN KANINCHENNIERE

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF. 94304

GOTTFRIED FUCHS
MÜNCHEN

1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153723_0169

Aus der experimentellen Abteilung (Prof.Dr.W.Brendel) der
CHIRURGISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

(Prof. Dr.Dr.h.c. R.Zenker)

Experimentelle Untersuchungen über den Energiestoffwechsel
der kühlkonservierten Kaninchenniere

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gottfried Fuchs

aus

Zweibrücken

Jahr

1 9 6 7

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Priv.Do. Dr.M.Schmidt-Mende

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Brendel

Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 3.10.1967

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

Inhaltsverzeichnis

Seite

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
--------------------------------------	---

I. THEORETISCHE VORBEMERKUNGEN

1. Stoffwechselstatus der normalen Niere	3
2. Stoffwechselveränderungen nach normothermer Ischämie	6
3. Schlußfolgerung	7

II. <u>EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER TEMPERATUR- UND</u> <u>ZEITABHÄNGIGKEIT DER STOFFWECHSELVORGÄNGE AN KÜHL-</u> <u>KONSERVIERTEN KANINCHENNIEREN</u>	8
--	---

A. Methodik

1. Tierexperimenteller Teil	8
2. Analytischer Teil	10

B. Ergebnisse

1. Stoffwechseluntersuchungen über den Einfluß der Kühlgeschwindigkeit an perfundierten Nieren	14
2. Stoffwechseluntersuchungen an perfundierten Nieren nach 6- und 12-stündiger Lagerung bei +4°, -4° und -25°C	17
3. Stoffwechseluntersuchungen an perfundierten Nieren nach Lagerung über einen Zeitraum von 1, 3 und 6 Tagen bei -4°C und -25°C	25

III. DISKUSSION

1. Stoffwechselprobleme bei künstlicher Unter-
kühlung 32
2. Temperaturabhängigkeit des Energiestoffwechsels 35
3. Energiestoffwechsel und Wiederbelebungszeit 42

IV. ZUSAMMENFASSUNG 44V. LITERATURVERZEICHNIS 47

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG:

Transplantation ist nichts Neues. Gewebe mit geringer Stoffwechselaktivität wie Haut, Knochen, Blutgefäße überträgt man schon seit längerer Zeit. Auch ihre Aufbewahrung stellt keine größeren Probleme mehr, man hat dafür bereits Gewebsbanken eingerichtet. Da diese Möglichkeit bei der Verpflanzung höher spezialisierter Organe, wie die Nieren, noch nicht besteht, stellt sich das Problem, das benötigte Organ im Bedarfsfall auch zur Verfügung zu haben (Kolff, Dunea u.a.).

Es kommt darauf an, Nieren konservieren, d.h. funktionstüchtig erhalten zu können für den Zeitpunkt der Verwendung.

Dafür muß eine Methode gefunden werden.

Vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Versuch, diesem Ziel durch Unterkühlung näherzukommen und legt die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen über den Energiestoffwechsel der kühlkonservierten Kaninchenniere vor.

Der Stoffwechsel der Niere ist gleich dem anderer Zelleinheiten auf die Bereitstellung einer für die Zellfunktion ausreichenden Energie gerichtet. Die Höhe des Energieumsatzes steht mit Organfunktion und Strukturhaltung in enger Wechselbeziehung. Eine Unterbrechung der Blutzufuhr und Sauerstoffversorgung führt in einem charakteristischen Ablauf zu einer stufenweisen Einengung der Funktion: Auf ein störungsfreies Intervall folgt mit sinkendem Energieniveau ein Stadium beeinträchtigter Funktion. Eine weitere Drosselung hat bei Unterschreitung des Erhaltungsumsatzes Strukturzerfall und Zelltod zur Folge. Die Summe dieser Stadien bis zum Eintritt irrever-

sibler Schädigung wird unter dem Begriff "Wiederbelebungszeit" (58) zusammengefaßt. Innerhalb dieser Wiederbelebungszeit bewirkt die Zufuhr von Blut bzw. Sauerstoff nach einer bestimmten Latenz eine Rückkehr zur vollen Funktion.

Wiederbelebungszeit und Energiestoffwechsel stehen zu einander in Beziehung: Wie experimentelle Untersuchungen an Gewebstücken verschiedener Säugetierorgane gezeigt haben, (63), steigt mit sinkender Körpertemperatur die Wiederbelebungszeit exponentiell an, der Sauerstoffverbrauch dagegen wird exponentiell herabgesetzt. Daraus hat THAUER (1956) den Schluß gezogen, daß die Wiederbelebungszeit mit abnehmender Körpertemperatur dem Sauerstoffverbrauch umgekehrt proportional ist.

Auf diese Erkenntnisse gründet sich unser Plan, die Niere zu unterkühlen, mit dem Ziel, die Wiederbelebungszeit zu verlängern. Die Bestimmung des Energiestoffwechsels in seinen biochemischen Äquivalenten liefert uns dabei eine wichtige Voraussetzung auf diesem Weg.

Die Arbeit steht in dem großen Rahmen der Bemühungen um die Konservierbarkeit der Niere zu klinischer Verwendung bei der Transplantation.

I. THEORETISCHE VORBEMERKUNGEN:

1. Stoffwechselstatus der normalen Niere

Der Stoffwechsel der Zelle stellt ein offenes System von vernetzten, enzymatischen Prozessen dar. Dieses System läßt sich als ein Spektrum von Reaktionsgeschwindigkeiten als Funktion der wirksamen Enzymkonzentration beschreiben, deren Produkte mit den dazugehörigen Intermediaten den Fluß in jedem Abschnitt des Systems ergeben. Das System wird durch exogene Substrate (Sauerstoff, Glykogen, Glucose usw.) aktiviert und führt zur Ausbildung von Fließgleichgewichten. Durch chemische Vernetzung der einzelnen Prozesse sowie durch Membranfunktionen (Kompartimente) wird der allgemeine Ablauf des Stoffwechsels koordiniert. Koordinierende Metabolite sind gleichzeitig Reaktionspartner mehrerer Prozesse und reagieren an den Kontrollpunkten des Stoffwechsels.

Die energetische Regulation wird durch Hintereinanderschaltung der Energieübertragungssysteme erreicht. So steuert die ATP-Spaltung die Geschwindigkeit der Glykogenolyse, die ihrerseits die Größe des oxydativen Tätigkeitsstoffwechsels bestimmt.

Die Lokalisation von Atmung und Glykolyse im zytoplasmatischen oder mitochondrialen Kompartiment legt zunächst für jeden zellulären Typ die räumliche Ausdehnung fest. Innerhalb der größeren Zellgemeinschaft können wiederum als Ausdruck einer verschiedenen Funktion Unterschiede in der Energieausstattung bestehen.

Das Energieprofil und der Stoffwechsel des Nierenmarkes sind grundsätzlich verschieden von demjenigen der Nierenrinde. Das Markgewebe bezieht den Großteil seiner Stoffwechselenergie aus anaeroben, glykolytischen Prozessen (32, 34), ebenso die Glomerula, während die oxydative Phosphorylierung in der Niere ausschließlich eine Funktion der Tubuli ist. Auf einen hohen Energiebedarf weist die Tatsache hin, daß die Niere bezogen auf die Gewichtseinheit mit 9 cm^3 (min. 100 g Gewebe)^{-I} den höchsten O_2 -Verbrauch von allen Säugetierorganen besitzt. Das Mark hat daran nur geringen Anteil. Sein O_2 -Verbrauch ist mit $0,34 \text{ cm}^3$ (min. 100 g Gewebe)^{-I} fast 30 mal geringer als in der Rinde, (KRAMER). Dieser niedrigen Sauerstofferfordernis des Markgewebes ist die Markdurchblutung angepaßt. Sie macht bei einem Gewebsanteil von etwa 20 % nur 1 % der Gesamtdurchblutung aus.

Die vielfältigen Stoffwechselleistungen, die die Niere im Verlauf der Harnbereitung vollbringt, sind hauptsächlich an diese mitochondrienreichen Zellen der Tubulusabschnitte gebunden, die sich durch einen lebhaften oxydativen Stoffwechsel auszeichnen. Durch intensive Phosphorylierungsprozesse wird in diesen Teilen des Nephrons ein beträchtlicher Vorrat an leicht verfügbarer Energie in Form von ATP ständig aufrecht erhalten. Das Ausmaß der "Ruhe"-umsetzungen ist erstaunlich. FLECKENSTEIN (18) wies nach, daß die Niere im Vergleich mit anderen Organen die absolut höchste Umsetzungsanzahl energiereicher Phosphorverbindungen aufweist.

In der nachfolgenden Tabelle haben wir die nach den heute üblichen Bestimmungsmethoden gemessenen "Normalwerte" der energiereichen Phosphate und des Kohlehydratstoffwechsels aus der Literatur mit den von uns gewonnenen Meßwerten verglichen.

	[$\mu\text{mol/g}$]	ATP	ADP	AMP	PO_4^{3-}	Lactat
Gerlach (Rattenniere)		2,10	0,68	0,43	3,14	
Thorn (Kaninchen)		2,16	0,70		2,45	1,40
v.Wichert (Kaninchen)		2,17				1,39
Eigene Werte (Kaninchen)		2,76	0,79	0,45	2,49	2,64

Tab. 1 Metabolitkonzentrationen in der Gesamtniere

Für die unbelastete, gut versorgte Niere läßt sich übereinstimmend aussagen, daß sie einen niedrigen Gehalt an anorganischem Phosphat, AMP und ADP aufweist und einen für das Organ charakteristischen hohen Wert an energiereichem ATP. Entsprechend hoch ist der Wert für den Quotienten ATP / ADP. Niedrig ist die Milchsäurekonzentration, da die glykolytische Reaktion im Rindenbereich nur einen Nebenschluß darstellt. Über eine PCr-Reserve verfügt die Niere nicht. Das spurenhafte Vorkommen scheint auf die glatten Muskelzellen der Gefäße beschränkt zu sein, (68). Glukose und Glykogen, diese wichtigsten Substrate der Zellatmung, finden sich in der Niere nur in auffallend niedrigen Konzentrationen (Glukose - 3,49 mmol/l, Glykogen - 1,77 mmol/l).

2. Stoffwechseleränderungen nach normothermer Ischämie

Um einen Vergleich mit unseren nachfolgenden Stoffwechseluntersuchungen an der kühlgelagerten Niere zu haben, seien zunächst die Befunde von THORN und GERLACH bei normothermer Ischämie umrissen. Die für normal durchblutete Nieren typische Konzentrationsverteilung erfährt an ischämischen Nieren infolge von Abbauprozessen tiefgreifende Veränderungen. Bereits nach 20 Sekunden ist die ATP-Konzentration um mehr als 40 % abgesunken. Über eine transitorische Zunahme von ADP erfolgt während der ersten Minuten ein kontinuierlicher Anstieg von AMP. Die Orthophosphat-Konzentration erhöht sich infolge der beträchtlichen Verminderung energiereicher Phosphatbestände bereits innerhalb einer Minute auf das Doppelte (GERLACH 22). Der von Thorn nach 5 Minuten akuter Ischämie gefundene ATP-Wert betrug etwa 1/4 des Kontrollwertes.

Minuten [$\mu\text{mol/g}$]	ATP	ADP	AMP	ATP/ADP	PO_4^{3-}	MS	BTS
3	0,366	0,73		0,52		3,45	0,020
5	0,386	0,82		0,45		4,50	0,014
10	0,280	0,61		0,45		5,70	0,009
60	0,020	0,66		0,45	10,30	12,80	0,011
120	0,022	0,20		0,11	9,35	13,05	0,013
180		0,14	0,28			12,80	

Tab. 2 Metabolitkonzentrationen nach normothermer Ischämie
(nach THORN und Mitarb.)

Die Untersuchergruppen fanden übereinstimmend, daß eine akute Ischämie einen innerhalb weniger Sekunden einsetzenden massiven

Zusammenbruch der energiereichen Adenosintri- und -diphosphate und einen entsprechend starken Anstieg der Monophosphate verursacht. Der Gesamtgehalt der Niere an Nucleotiden ändert sich dabei anfänglich nicht. Erst bei längerem Sauerstoffmangel kommt es durch Abbau über die Adenosinmonophosphat-Stufe hinaus zu einer progredienten Verminderung der Summe der Nucleotide. Auslösendes Moment hierfür dürfte ein über das physiologische Maß hinausgehendes Substratangebot an die beteiligten Enzyme sein. Der Abbau endet im Xanthin als Endprodukt. Eine weitere Oxydation zu Harnsäure erfolgt nicht. Zweckmäßig erscheint bei teleologischer Betrachtungsweise, daß der am Herzmuskel und Gehirn beobachtete Abbau des AMP zu Adenosin in der Niere unter anaeroben Bedingungen nicht stattfindet. Adenosin wirkt am Hirn und Herzen vasodilatorisch, an der Niere dagegen vasokonstriktorisch (22). Der an sich schon niedrige normale Glykogengehalt der Niere war in Versuchen von THORN (65) nach anoxischer Belastung von 15 min Dauer auf rund ein Drittel = $0,5 \text{ m mol/l}$ abgesunken. Gleichzeitig fanden sich erhebliche Mengen an freier Glucose in einem Streubereich von $5,16 - 12,28 \text{ m mol/l}$. Der unter gleichen Bedingungen gemessene Lactatgehalt von $6,10 \text{ m mol/l}$ lag demgegenüber erstaunlich niedrig.

3. Schlußfolgerung

Die vorausgegangenen Untersuchungen haben die Niere als ein Organ charakterisiert, dessen Energiereserve den vielfältigen Anforderungen der Zellfunktion und Zellerhaltung nur wenige

Minuten genügt, wenn die Blutzufuhr zum Stillstand gekommen ist. Die Zeitspanne zulässiger Unterbrechung der Blutversorgung müßte sich jedoch dann verlängern lassen, wenn man durch künstliche Unterkühlung des Organs eine Dämpfung des Stoffwechsels erreicht. Unsere Untersuchungen wollen nun zur Klärung beitragen, auf welche Weise und in welchem Ausmaß der Energiestoffwechsel der Niere durch Anwendung der Hypothermie beeinflußt werden kann.

In verschiedenen Temperaturbereichen soll die durch Perfusion gekühlte Niere unterschiedlich lange aufbewahrt werden. Als Kriterium in der Beurteilung ihres Zustandes entfällt an der extrakorporal gelagerten Niere die Funktion. Jedoch erlaubt die Bestimmung des Energiestoffwechsels in den Metaboliten des Adenylsäuresystems und der anaeroben Glykolyse definierte Aussagen. Ihre Bestimmung ist als Ausdruck für das Gleichgewicht zwischen Energieversorgung und Energiebedarf allgemein anerkannt.

II. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER TEMPERATUR- UND ZEITABHÄNGIGKEIT DER STOFFWECHSELVORGÄNGE AN KÜHLKONSERVIERTEN KANINCHENNIEREN

A. Methodik

1. Tierexperimenteller Teil

Die vorliegenden Versuche wurden in der Zeit von April bis November 1964 ausgeführt. Als Versuchstiere dienten erwachsene Kaninchen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht

von 2,5 kg. In Nembutalnarkose wurde die Bauchhöhle durch mediane Laparatomie eröffnet, die Nieren freigelegt und mit einer Styroporkapsel umgeben. Sodann wurde die Aorta und Vena cava distal und proximal von der Einmündung der Nierengefäße freigelegt und mit je einem starken Faden umgeben. Die A. mesenterica cranialis sowie beide Nierenarterien und -venen wurden ligiert. Anschließend erfolgte die Kanülierung der Aorta und Vena cava distal der Einmündung der Nierengefäße mit Nylonkathetern. Nach Ligatur von Aorta und Vena cava proximal der Nierengefäße begann die Perfusion der Nieren über den in der Aorta liegenden Katheter. Der venöse Ausstrom wurde aufgefangen.

Perfusionsanordnung

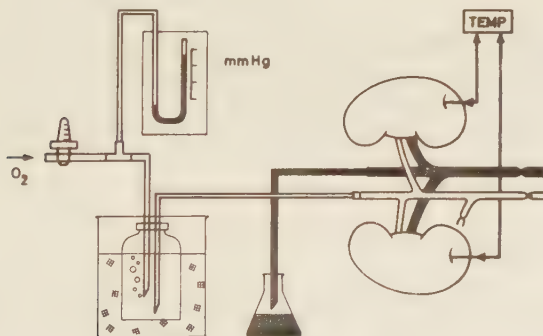


Abb. 1: Schematische Darstellung der Methode der Nierenkühlperfusion in situ beim Kaninchen

Als Perfusat verwendeten wir 15%iges Glyzerin in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von 50 ml 2%igem Novokain und 10 mg Heparin/l. Das Perfusat wurde mit Sauerstoff (3 l/min)

durchströmt. Der Perfusionsdruck betrug 100 mm Hg; die Temperatur des Perfusates lag bei -3° bis -4° C. Die Perfusion dauerte im Mittel 3-5 Minuten. Während dieser Perfusion wurde die Nierentemperatur fortlaufend mit einem elektrischen Fühler kontrolliert, sie betrug im Mittel nach Auskühlung 3° C.

Gleich nach Beginn der Perfusion zeigten die Nieren eine Bläßfärbung; der venöse Ausstrom war gegen Ende der Perfusion fast klar, die Schwellung der Nieren gering. Bei Erreichen einer Nierentemperatur von 3° C wurden beide Nieren herausgenommen und in Plastikbeutel eingelegt. Nun erfolgte die Lagerung im Eisschrank: für die Temperaturgrade $+4^{\circ}$ C und -4° C durch Einlegen der Plastikbeutel in eine $+4^{\circ}$ C bzw. -4° C kalte Glyzerinlösung, zur Aufbewahrung bei -25° C durch Einlegen der Beutel in entsprechend kaltes unverdünntes Glyzerin.

Am Ende der jeweiligen Lagerungszeit wurde die Niere mit einer vorgekühlten Frierstopzange dem Beutel entnommen und sofort in flüssige Luft untergetaucht. Danach erfolgte die weitere biochemische Aufarbeitung.

2. Analytischer Teil

Das analytische Verfahren gliedert sich in drei Abschnitte:

- 1.) Fixierung (Frierstop des augenblicklichen Status im Gewebe);
- 2.) Extraktion der Metabolite aus dem Gewebe;
- 3.) Bestimmung der Metabolite im Extrakt.

Zur Fixierung wurde die ganze Kaninchenniere zwischen Metallblöcke gepreßt, die in flüssiger Luft vorgekühlt waren, und

in flüssige Luft geworfen. Durch Zerreiben in einem vorgekühlten Porzellanmörser unter häufigem Übergießen von flüssiger Luft wurde das Gewebstück pulverisiert. Ein Teil des Pulvers wurde dann in eine vorgewogene Menge eiskalter 6%iger Perchlorsäure gegeben. Das Gewebspulver darf dabei nicht an der Gefäßwand hängen bleiben. Nach Wägen des Gefäßes und der Gewebprobe wurde kurz (30 sek.) homogenisiert und dann bis zu einer Verdünnung von 1:10 gekühlte Perchlorsäure zugegeben.

Es ist nötig, sehr rasch zu arbeiten, weil aus der wärmeren Luft von dem kalten Gewebspulver Wasser absorbiert wird, das zu Verfälschungen der Einwaage führen kann. Weiterhin ist darauf zu achten, daß die Ablesung auf der Waage bei Gewichtskonstanz erfolgt, d.h. erst dann, wenn die miteingebrachte Luft vollständig abgeraucht ist.

Das Homogenisat wurde 5 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert, der Überstand dekantiert. Durch Titration mit 1 m Kaliumkarbonatlösung unter Eiskühlung und gutem Durchmischen wurde der pH des Extraktes auf 7,5 eingestellt. Als Indikator für den Endpunkt der Titration diente Methylrot (0,1 %).

Zur Blutgewinnung wurde aus einem in die Aorta eingebundenen Katheter Blut in ein vorgewogenes Gefäß mit kalter 6%iger Perchlorsäure pipettiert, kräftig umgeschüttelt und zurückgewogen, 1 ml Blut auf 5 ml Perchlorsäure.

Zur Bestimmung der Stoffwechselmetabolite bedienten wir uns der enzymatischen Analyse nach dem Prinzip des optischen Tests von Warburg. Grundlage dieses Tests ist die photometrische

Messung von Extinktionsänderungen eines der an der Reaktion teilnehmenden Coenzyme. Alle Tests stellen "Endwertbestimmungen" dar, d.h. man mißt den gesamten Umsatz unter Enzymüberschuß.

Alle Werte wurden in Doppelbestimmungen gewonnen. Die benötigten Substanzen und Enzyme bezogen wir von der Fa. C.F. Boehringer, Tutzing. Die angegebenen Arbeitsvorschriften wurden weitgehend beibehalten. Auf diese Weise erfolgte die Bestimmung der Stoffwechselsubstrate ATP, ADP, AMP, Lactat und Pyruvat.

Das anorganische Phosphat wurde bestimmt nach Fiske-Subbarow, modifiziert nach Lowry und Lopez. Die Bestimmung des Leerwertes machte eine Blutkorrektur nötig. Für den Gewichtsanteil und Metabolitanteil des Blutes gilt die Beziehung:

$$\frac{\text{Gewebsgehalt} - (\text{Gewichtsanteil} \times \text{Metabolitgehalt}) \text{ Blut}}{1 - (\text{Gewichtsanteil}) \text{ Blut}}$$

Die Blutbestimmung wurde nach dem von HOHORST, KREUTZ und BÜCHER vorgeschlagenen Verfahren vorgenommen, das auf einer photometrischen Bestimmung des relativen Oxyhämoglobingehaltes in Organ und Blut beruht.

Alle mitgeteilten Werte sind auf mMol/g Feuchtgewicht Nierengewebe berechnet.

Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, DAP = Dihydroxyacetonphosphat, DPN und DPNH = oxydiertes und reduziertes Diphosphopyridinnucleotid, LDH = Lactatdehydrogenase, KH = Kohlehydrat, PGK = Phosphoglyzeratkinase, 3-PG = 3 Phosphoglyzerat, 1,3 PG-P = D - 1,3 Diphosphoglyzerat, PCr = Phosphokreatin, RP = Redoxpotential.

Kritik der Methodik

1. Aus technischen Gründen konnte an den hartgefrorenen Nieren der Mark-Rindenanteil nicht immer konstant gehalten werden. Bei dem bekannten Unterschied im Energieverteilungsmuster der Nierenbereiche mag dies die manchmal über das physiologische Maß hinausgehende Schwankungsbreite der Ergebnisse erklären.

2. Die enzymatische Bestimmung von ATP ist in Anlehnung an die Boehringer-Test-Methode für das Blut erfolgt. In einem ersten Reaktionsschritt wird durch Katalyse des Enzyms PGK $3\text{-PG} + \text{ATP}$ in $1,3\text{ PG-P} + \text{ADP}$ übergeführt.

Die Messung des gebildeten $1,3\text{ PG-P}$ entspricht der im Blut gesuchten ATP-Konzentration. Für die exakte Konzentrationsbestimmung des Gewebs-ATP muß jedoch eine Korrektur durchgeführt werden, denn im Gewebe finden sich bereits primär geringe Mengen von $1,3\text{ PG-P}$. Der somit bestimmte ATP-Wert ist um den $1,3\text{ PG-P}$ Gewebsanteil zu hoch. Da jedoch der PG-P-Pool im Gewebe niedrig ist und sich unter den verschiedenen Bedingungen nicht ändert, haben wir auf die Korrektur verzichtet, weil die Gültigkeit der Relationen und damit die Aussagekraft nicht gemindert wird.

3. Durch die nicht absolute Spezifität der enzymatischen Tests werden in geringem Maße auch andere Nucleosidtri-, di- und monophosphate erfaßt. Die damit bestimmten Werte liegen deshalb höher als die vergleichbaren Ergebnisse bei Papier- oder Elutionschromatographischer Arbeitsweise.

4. Die angegebenen Konzentrationen der Substrate und Metabolite sind Durchschnittswerte für das Gesamtgewebe. Weder die Differenzierung der Zellen im Gewebe noch Unterschiede in der Verteilung durch morphologisch gegebene Struktureinheiten werden durch die angewandte Methode berücksichtigt.

B. Ergebnisse

An 112 Kaninchennieren wurde der Einfluß von Temperatur und Zeit auf die Stoffwechselvorgänge der Niere außerhalb des Körpers untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Nieren in 3 Versuchsreihen in unterschiedlicher Weise gekühlt und gelagert und ihr jeweiliger Gehalt an den einzelnen Stoffwechselmetaboliten quantitativ festgestellt. Zur Bestimmung gelangten Pyruvat und Lactat als Endstufen der anaeroben Glykolyse, die Adenosinnucleotide ATP, ADP, AMP, als Repräsentanten des energieverteilenden Systems und das anorganische Phosphat.

Versuchsreihe 1: Stoffwechseluntersuchungen über den Einfluß der Kühlgeschwindigkeit an perfundierten Nieren

An einer Serie von 15 Kaninchen wurde zunächst der Einfluß der durch Perfusionskühlung erreichten Kühlgeschwindigkeit auf die Stoffwechselsituation geprüft. In Abänderung der oben beschriebenen Methodik wurde hier die Temperatur des Perfusates variiert, so daß wir nach 6 Minuten die gewünschte Endtemperatur erreichten. Die Perfusionsdauer blieb nach Möglichkeit konstant.

T (6min.)	ATP	ADP	AMP	Lactat
22°C	0,89	1,19	1,54	7,63
16°C	0,70		1,31	4,34
10°C	1,21	1,03	0,87	2,41
4 - 5°C	1,65	0,72	0,44	1,94
2°C	1,99	0,62	0,40	1,50

Abhängigkeit der Metabolite (uMol/g) von der erreichten
Endtemperatur (T) bei gleicher Perfusionsdauer (6 Min.).
Mittelwerte aus je 3 Versuchen.

Tab. 3

Es zeigt sich hierbei deutlich, daß der Phosphonucleotidabbau mit fallender Temperatur verlangsamt abläuft.

So liegt der bei 2°C gemessene ATP-Wert um 100 % über dem bei 22°C gefundenen Wert. Die entsprechende Stoffwechselsituation spiegelt sich in den ADP- und AMP-Werten wider. Während bei 22°C schon ein Großteil der Phosphonucleotide die Stufe der Monophosphate erreicht hat, überwiegt bei 2°C der Anteil des Triphosphates noch eindeutig.

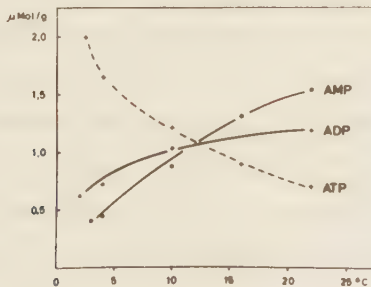


Abb. 2

Das Verhalten des Lactats zeigt den Versuch der Zelle, das wachsende Energiedefizit durch anaerobe Energiegewinnung zu decken. Der Lactatgehalt der untersuchten Nieren fällt kongruent mit der Temperaturerniedrigung ab. Hier ist die Differenz zwischen der Endtemperatur von 22°C und 2°C sogar über 500 %.

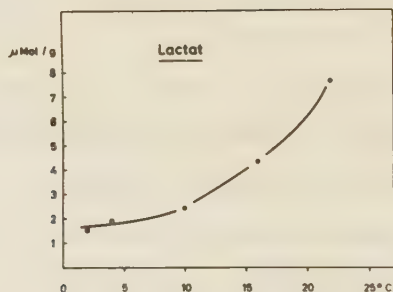


Abb. 3

Aus diesen Ergebnissen haben wir für unsere weiteren Stoffwechseluntersuchungen folgenden Schluß gezogen: Bei konstanter Kühldauer findet man parallel zur erreichten Endtemperatur der Nieren eine deutliche Stoffwechselsenkung, sowohl im Bereich der aeroben als auch der anaeroben Energiefreisetzung. Das Ergebnis kennzeichnet den Einfluß der Kühlgeschwindigkeit auf das Stoffwechselgeschehen. Um eine günstige Ausgangssituation für die Kühlkonservierung zu erreichen, empfiehlt sich eine rasche und vollständige Auskühlung der Organe vor der Kühllagerung. Unter den hierfür in Frage kommenden verschiedenen Kühlverfahren dürfte die Perfusionskühlung am effektivsten sein.

Versuchsreihe 2: Stoffwechseluntersuchungen an perfundierten Nieren nach 6- und 12-stündiger Lagerung bei $+4^{\circ}$, -4° und -25°C

Aufbauend auf diesen Ergebnissen interessierte uns in einer zweiten Versuchsreihe das weitere Stoffwechselgeschehen der anoxisch extrakorporal gelagerten Niere in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und Lagerzeit. Da uns Informationen über den Stoffwechsel in Nähe des Nullpunktes und in "Tiefkühlung" bis in den Bereich der Eisbildung wichtig erschienen, wählten wir die Lagerungstemperaturen von $+4^{\circ}$, -4° und -25°C . Die durch Perfusion im Mittel auf 3°C ausgekühlten Nieren wurden bei diesen Temperaturen für 6 bzw. 12 Stunden im Eisschrank gelagert und anschließend biochemisch untersucht.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der so behandelten Kaninchennieren sind in der folgenden Tabelle (4) zusammengefaßt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils 4 Einzelwerten.

Tabelle:

	ATP	ADP	AMP ($\mu\text{Mol/g}$)	Lactat	Pyruvat	PO ₃ - ₄	ATP/ADP	ADP/AMP	Lactat- Pyruvat
Leerwert	2,76 ± s 0,303	0,79 0,068	0,45 0,135	2,64 0,401	0,163 0,073	2,49 0,494	3,48	1,49	18,28
Kontrollwert	1,54 ± s 0,270	0,72 0,221	0,71 0,172	1,22 0,549	0,084 0,008	3,18 0,653	2,30	1,09	14,47
6 h	± 30°C ± s 0,074	0,53 0,074	2,00 0,141	3,73 0,856	0,044 0,015	8,95 0,393	0,52	0,26	87,73
± 30°C ± s	0,41 0,118	0,62 0,182	2,28 0,321	1,76 0,499	0,040 0,007	6,67 0,222	0,67	0,27	43,27
-25°C ± s	0,94 0,220	0,66 0,148	1,82 0,132	1,26 0,393	0,063 0,011	4,02 0,199	1,44	0,37	20,64
12 h	± 30°C ± s 0,052	0,46 0,035	1,57 0,145	5,10 1,178	0,032 0,008	9,99 2,294	0,45	0,30	165,70
± 30°C ± s	0,36 0,036	0,44 0,099	1,90 0,263	2,01 0,568	0,030 0,007	7,17 1,302	0,88	0,24	73,73
-25°C ± s	0,61 0,188	0,75 0,138	1,60 0,258	1,56 0,764	0,049 0,009	6,40 1,066	0,76	0,49	35,53

Stoffwechseluntersuchungen an der Kaninchenniere nach 6- und 12-stündiger Lagerung bei +4, -4 und -25°C.

Der Verlauf des Phosphonucleotidabbaus unter hypothermen Bedingungen folgt dem Grundprinzip des normotherm-anoxischen Abbaus in der Niere. Auch hier wird als Ausdruck einer gestörten Energieversorgung der Gehalt an ATP vermindert. Nach einem steilen initialen Abfall mündet der Kurvenverlauf in ein stabileres Niveau ein. Die Spaltung ist in den tieferen Temperaturbereichen jedoch gegenüber den höheren erheblich verlangsamt. So liegt zum Beispiel der ATP-Spiegel bei -4°C und 12 Stunden Lagerung noch über dem 6-Stunden-Wert bei der $+4^{\circ}\text{C}$ -Lagerung. Noch günstiger erweisen sich die Verhältnisse bei der Kühl Lagerung von -25°C . Hier überschreitet der 6-Stundenwert des ATP den -4°C -Wert um 117 % und den bei $+4^{\circ}\text{C}$ gemessenen um 235 %.

In den folgenden 3 Abbildungen haben wir die temperaturabhängigen Veränderungen der energiereichen Phosphate ATP, ADP, AMP und die dazugehörigen Veränderungen des anorganischen Phosphates bei den verschiedenen Lagerungstemperaturen gegenübergestellt.

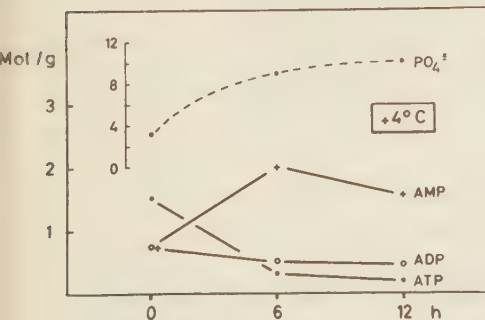


Abb. 4

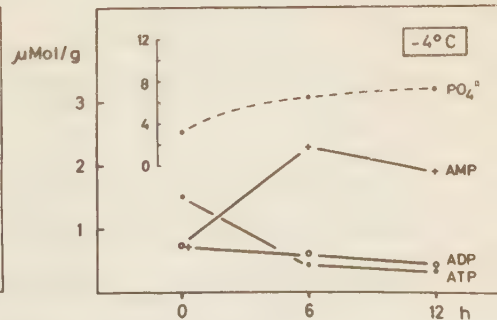


Abb. 5

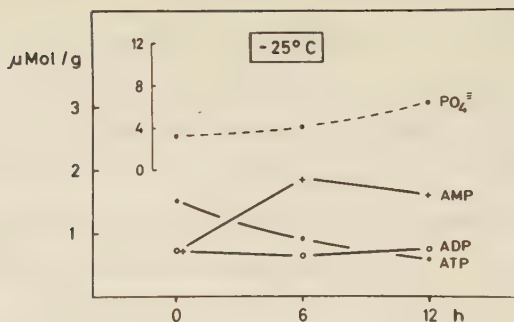


Abb. 6

Abb. 4, 5, 6: Einfluß der Zeitdauer der Kühllagerung bei $+4^\circ$, -4° und -25°C auf die Konzentration der säurelöslichen Phosphorverbindungen und des anorganischen Phosphates.

Analog dem verzögerten Abbau des ATP mit sinkender Lagerungstemperatur finden wir auch für das ADP und AMP verlangsamte Konzentrationsverschiebungen bei den kälteren Lagerungsbedingungen.

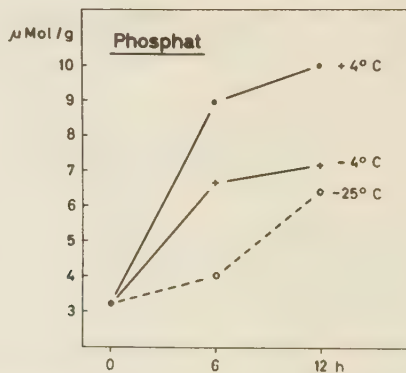


Abb. 7: Veränderungen der Konzentration des anorganischen Phosphates in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und der Zeitdauer der Kühllagerung.

Der Zuwachs des freien Orthophosphats nimmt mit sinkender Lagerungstemperatur entsprechend der geringeren Phosphatfreisetzung ab. Die gefundenen Konzentrationen übersteigen jedoch das theoretisch erwartete Ergebnis. Nach 6-stündiger Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ finden sich $8,95 \text{ m}\mu\text{Mol/g PO}_4^{3-}$ statt der errechneten $6,05 \text{ m}\mu\text{Mol/g}$. Nach 12 Stunden bei -4°C sind es sogar $9,99 \text{ m}\mu\text{Mol/g PO}_4^{3-}$ statt $6,83$. In den tiefen Temperaturen sind die Fehlbeträge weniger ausgeprägt. Nach Lagerdauer von 6 Stunden bei -25°C liegt der Wert im Bereich der normalen Schwanungsbreite ($4,02 \text{ m}\mu\text{Mol/g}$ statt $3,99$). ✓

Nach 12 Stunden wurden für die gleiche Temperatur $6,5 \text{ m}\mu\text{Mol/g PO}_4^{3-}$ statt $5,02$ festgestellt.

Dieses Mißverhältnis kann einmal durch den über die Monophosphatstufe hinausgehenden Abbau der Adeninnucleotide verursacht sein (GERLACH und DEUTICKE 1963). Zum andern ließe sich diese Anreicherung auch durch eine in Anoxie eintretende Verminderung des RNS-Bestandes erklären, ein Befund, den THORN am normotherm-anoxischen Organ erhoben hat (70). Damit stünde im Einklang der sonst unerklärliche Anstieg der Adeninnucleotide. Durch AMP-Zuwachs aus RNS kommt es über einen vorübergehenden Stau der Summe der Adeninnucleotide dann zur progredienten Verminderung.

Nach 6 Stunden Lagerzeit wird das Bild bei allen Temperaturen durch das Zerfallsprodukt AMP beherrscht, im weiteren Verlauf findet sich dann eine abfallende Tendenz. Das ADP ändert sich konzentrationsmäßig nur wenig. Es ist anzunehmen, daß die Diphosphatstufe sehr rasch durchlaufen wird. Die Relationen

ATP / ADP und ADP / AMP sinken infolge der ständigen ATP-Abnahme und des AMP-Anstiegs beträchtlich ab, wodurch die freie Energie der ATP-Spaltung weiter gemindert wird.

Vergleicht man die Entwicklung der aeroben Energiefreisetzung in der ersten Lagerungsperiode von 6 Stunden mit der zweiten Lagerungsperiode von 12 Stunden, so findet man hier insgesamt flache Kurvenverläufe. Dies ist wohl teilweise durch die jetzt geringere Stoffwechselreserve, teilweise aber besonders bei den Lagertemperaturen unter 0° durch eine stabilisierte Temperaturlage zu erklären. Während in der ersten Lagerungsperiode von 6 Stunden die tatsächlichen Lagerungstemperaturen erst allmählich erreicht wurden, also noch ein Temperaturgefälle vorlag, kann man in der zweiten Lagerungsperiode mit konstanten Temperaturbedingungen rechnen.

Das Lactat, das am gut versorgten Organ nur in geringen Konzentrationen nachweisbar ist, bildet das Kriterium für den Ablauf der Glykolyse.

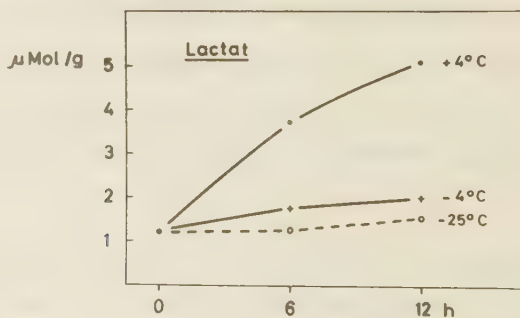


Abb. 8: Veränderung der Lactatkonzentration in der kühlgelagerten Niere in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und der Zeitdauer.

Die anaerob glykolytische Aktivität der Niere ist im Vergleich mit Herz, Hirn oder Muskel schwach entwickelt. Die geringen Kohlehydratbestände werden verzögert eingesetzt (68). Dem sprunghaften Abfall von ATP steht in unseren Befunden ein langsamer Milchsäureanstieg gegenüber.

Wie aus der Abb. 8 hervorgeht, ist die Differenz der Lactatkonzentration zwischen der Temperaturspanne von $+4^{\circ}\text{C}$ und -4°C beträchtlich. Das bedeutet, daß bei $+4^{\circ}\text{C}$ die Intensität der Glykolyse höher ist. Diese Beobachtung könnte zu einem Trugschluß veranlassen: Es ist nämlich nicht der hohe Lactatanstieg, der zu einer besseren anaeroben Energiebereitstellung in Form von ATP führt, wie dies der sinkende ATP-Gehalt beweist, sondern im Gegenteil: Eine Steigerung der Glykolyserate ist stets gekoppelt mit einem raschen ATP-Zerfall.

Die Unterschiede der Lactatkonzentrationen zwischen -4°C und -25°C -Lagerung sind nicht so ausgeprägt. Möglicherweise kommt neben der allgemeinen, temperaturbedingten Senkung der Stoffwechselgeschwindigkeiten in diesem tiefen Temperaturbereich durch ein gestörtes Zusammenspiel der Teilreaktionen eine spezifische Hemmung der Glykolyse hinzu.

Die Veränderungen der Pyruvat-Konzentrationen lassen das Bestreben des anoxischen Organs erkennen, durch Reduktion des Substrates oxydiertes Coenzym (DPN) zur Energiegewinnung bereitzustellen. Auch hier werden die temperaturabhängigen Unterschiede deutlich. Der Umsatz in den tieferen Temperaturen ist schonender.

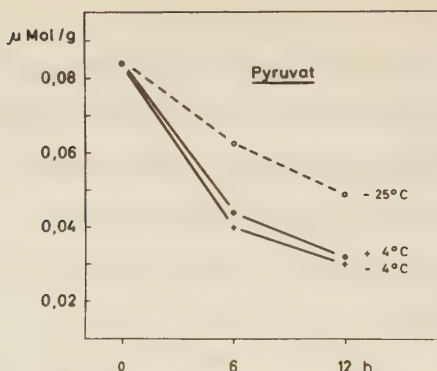


Abb. 9: Veränderung der Pyruvatkonzentration in der kühlgelagerten Niere in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und der Zeitdauer der Kühlagerung.

In stärkerem Ausmaß spiegelt der Lactat-Pyruvat-Quotient noch einmal die Verschiebung zum Ungleichgewicht wider. Die Abb. 10 veranschaulicht in aller Deutlichkeit die temperaturbedingten Unterschiede. So liegt der Lactat-Pyruvatquotient nach 12 Stunden Lagerung bei +4°C um fast 400 % über dem entsprechenden Wert bei -25°C.

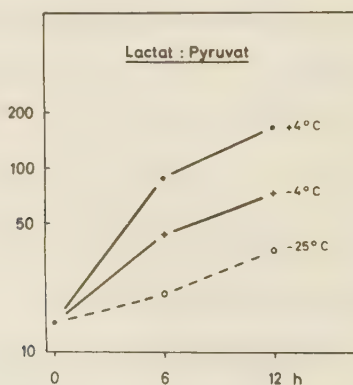


Abb. 10: Lactat-Pyruvat-Quotient nach 6- und 12-stündiger Lagerung bei +4°, -4° und -25°C.

Zusammenfassend läßt sich aufgrund der Stoffwechseluntersuchungen nach Kühllagerung von 6 bzw. 12 Stunden bei Temperaturen von $+4^{\circ}$, -4° und -25°C sagen, daß unter anoxischen Bedingungen sowohl der aerobe als auch der anaerobe Stoffwechsel der Niere eine klare kältebedingte Verlangsamung zeigen. Die Stoffwechselsituation der Kühllagerung erweist sich bei -4°C trotz der relativ geringen Temperaturdifferenz deutlich günstiger als bei $+4^{\circ}\text{C}$. Bei der "Tiefkühllagerung" von -25°C fanden sich die besten Stoffwechselergebnisse. Die Energiefreigabe in tiefen Temperaturen erscheint ökonomischer.

Versuchsreihe 3: Stoffwechseluntersuchungen an perfundierten Nieren nach Lagerung über einen Zeitraum von 1,3 und 6 Tagen bei -4° und -25°C

Nachdem der Endwert des ATP in den vorausgegangenen Untersuchungen nach 12-stündiger Kühllagerung bei -4°C noch 23 % und bei -25°C sogar noch 40 % des Kontrollwertes aufwies, interessierte uns nun der weitere Verlauf im Stoffwechselgeschehen der kühlgelagerten Niere. Wir dehnten deshalb unsere Untersuchungen auf mehrtägige Lagerzeiten aus. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle 5 zusammengefaßt. Es sind Mittelwerte aus jeweils 6 Versuchen.

Tabelle

	ATP	ADP	AMP (uMol/g)	Lactat	Pyruvat	PO ₄ ³⁻	ATP/ADP	ADP/AMP	Lactat- Pyruvat
Leerwert	2,76 ± s 0,303	0,79 0,068	0,45 0,135	2,64 0,401	0,163 0,073	2,49 0,494	3,48	1,49	18,28
Kontrollwert	1,54 ± s 0,270	0,72 0,221	0,71 0,172	1,22 0,549	0,084 0,008	3,18 0,653	2,30	1,09	14,47
-4°C	1 Tag ± s 0,061	0,99 0,168	1,69 0,143	4,34 2,576	0,044 0,009	8,76 1,426	0,27	0,58	100,01
3 Tage	0,17 ± s 0,025	0,37 0,071	1,43 0,128	6,22 1,056	0,034 0,007	8,40 0,734	0,47	0,26	181,00
6 Tage	0,12 ± s 0,027	0,26 0,012	0,77 0,032	8,07 1,656	0,018 0,006	13,80 1,419	0,45	0,34	494,50
-25°C	1 Tag ± s 0,075	0,97 0,116	0,87 0,090	1,39 0,662	0,083 0,019	4,53 0,633	1,08	1,12	17,70
3 Tage	1,02 ± s 0,245	1,50 0,201	1,04 0,103	0,94 0,768	0,037 0,007	5,07 0,497	0,69	1,47	25,40
6 Tage	0,74 ± s 0,193	1,07 0,174	1,27 0,353	2,56 0,483	0,052 0,013	5,40 0,501	0,69	0,82	49,80

Stoffwechseluntersuchungen an der Kaninchenniere nach 1, 3 und 6-tägiger Lagerung bei -4 und -25°C.

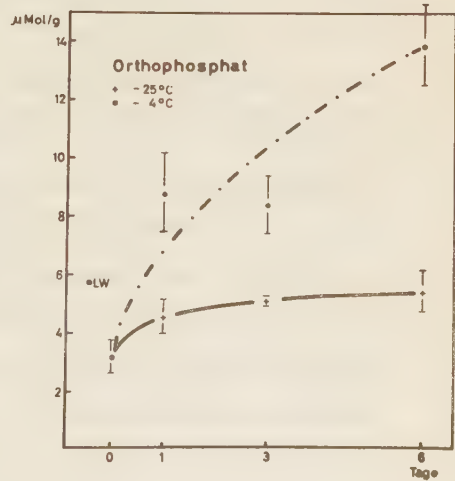
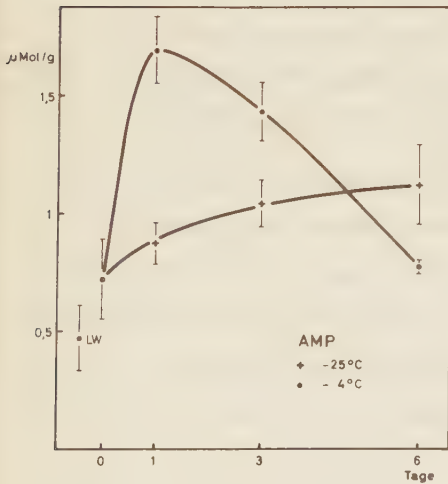
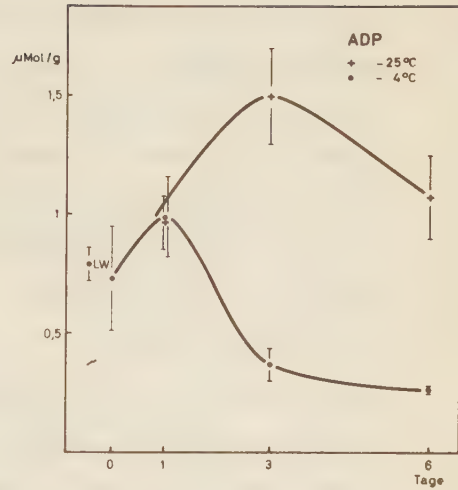
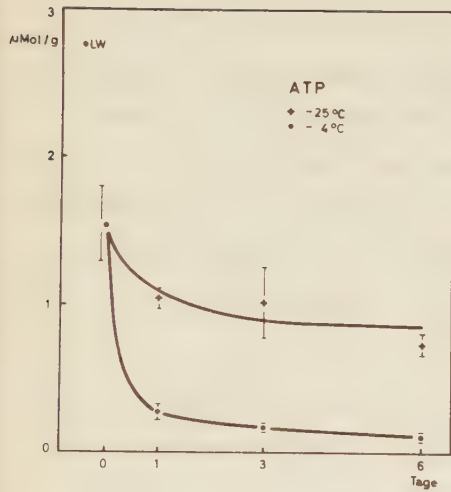


Abb. 11-14: Veränderungen der Metabolitkonzentrationen der kühlgelagerten Niere nach mehrtägiger Lagerzeit bei -4° und -25°C.

Der Kurvenverlauf des ATP zeigt erwartungsgemäß bei -4°C den steileren Abfall zum 1-Tage-Wert gegenüber der Kühllagerung bei -25°C . Bei beiden Lagertemperaturen zeichnet sich jedoch nach dem ersten Tag eine Wende ab. Der ATP-Spiegel ändert sich in der Folgezeit nur noch unerheblich, das Energiegleichgewicht scheint sich zu "stabilisieren". Wesentlich ist vor allem, daß das Energieniveau der Tiefkühllagerung am Ende des 6. Lagerungstages um den bedeutenden Betrag von $0,6 \text{ m}\mu\text{Mol/g}$ höher liegt.

Vergleicht man die ATP-Werte bei -25° mit den Kontrollwerten, d.h. den am Ende der Kühlperfusion gefundenen Werten, so findet man selbst nach 6 Tagen Kühllagerung erst eine Verminderung um 50 %. Der kritische Energieverlust liegt also in diesen Kühlbereichen in einer Anfangsphase während der ersten Stunden. Dieser Zeitraum fordert im Hinblick auf die Erholungsfähigkeit des Organs besonderes Interesse.

Die Konzentrationsverschiebungen unter den Di- und Monophosphaten entwickeln sich im Prinzip gleich. Es kommt durch rasche Spaltungen der Triphosphate zum sukzessiven Anstau zuerst auf der Di- dann auf der Monophosphatstufe. Nur läuft der Prozeß bei -25°C um ein Vielfaches langsamer ab. Dies ergibt auch der Verlauf des freien Phosphates.

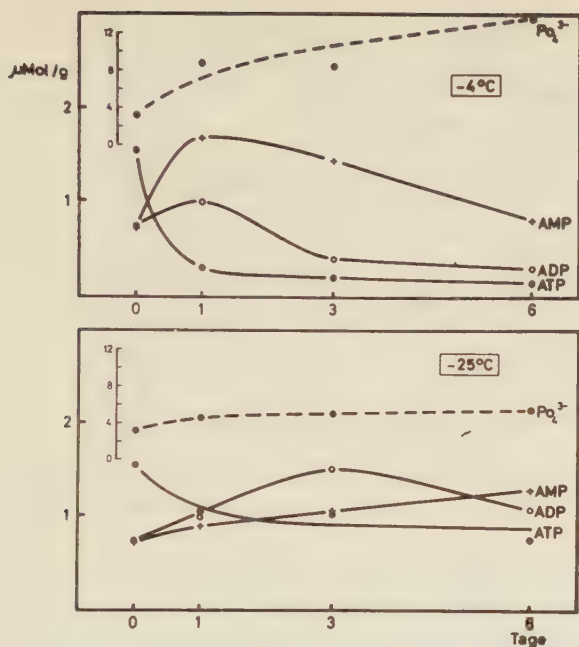


Abb. 15: Gegenüberstellung der Metabolitkonzentrationen während 6-tägiger Lagerdauer bei -4° und -25°C .

In der Gegenüberstellung der freien und nucleosidgebundenen Phosphate fällt noch einmal der in tiefer Lagertemperatur flachere Verlauf ins Auge. Das Kurvenbild bei -25°C erscheint gedämpft und auseinandergezogen. Der höchste Wert des AMP findet sich infolge des verlangsamten Stoffwechselgeschehens nicht wie bei der -4° -Lagerung schon am ersten Tag, sondern erst am 6. Lagerungstag, und der Kulminationspunkt scheint noch nicht erreicht zu sein, denn dieser 6-Tage-Wert liegt mit $1,12 \mu\text{Mol/g}$ noch unter dem AMP-1-Tagewert bei -4°C , der $1,69 \mu\text{Mol/g}$ beträgt.

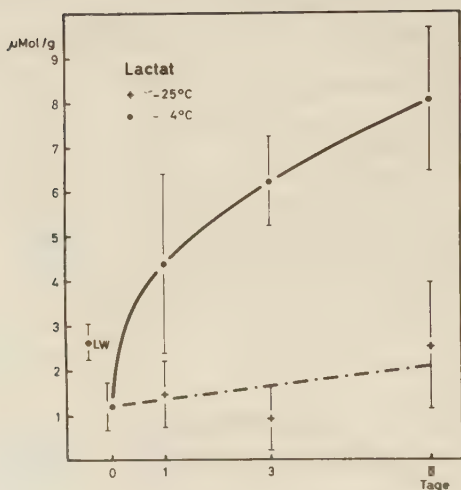


Abb. 16: Lactatveränderungen an der kühlgelagerten Niere in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und der Zeitdauer der Kühlagerung.

Unter anaeroben Bedingungen wird die Glykolyse zur entscheidenden Energiequelle der Zelle. Zieht man in Betracht, daß die Energiebereitstellung durch den Bedarf reguliert wird, so scheint der Kurvenverlauf des Lactats den energiesparenden Effekt der Kühlung deutlich zu demonstrieren. Die kompensatorische Zunahme der Brennstoffgewinnung auf glykolytischem Weg ist im tiefen Temperaturbereich ungleich ökonomischer. Aus der erheblichen Streuung der Einzelwerte kann man schließen, daß der glykolytische Einsatz nicht bei allen Tieren gleich erfolgt ist.

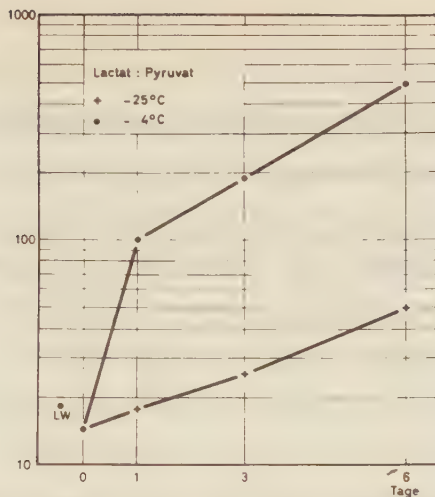


Abb. 17: Lactat-Pyruvat-Quotient nach Lagerung über 1, 3 und 6 Tagen bei -4° und -25°C .

Die temperaturbedingten Unterschiede im Pyruvatverhalten sind weniger stark ausgeprägt. Die Erklärung dieser geringeren Differenzen könnte in einem unterschiedlichen Temperaturverhalten der beteiligten Enzyme liegen.

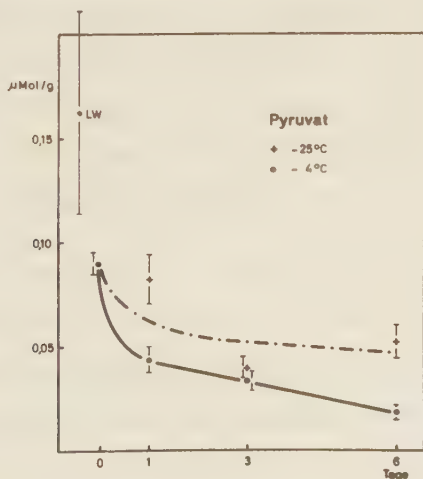


Abb. 18: Pyruvatveränderungen an der kühlgelagerten Niere nach mehrtägiger Lagerdauer bei -4° und -25°C .

III. DISKUSSION:

1. Stoffwechselprobleme bei künstlicher Unterkühlung

Es ist die unter der RGT-Regel bekannte Tatsache, daß die Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Umsetzungen mit sinkender Temperatur abnimmt. Auch die Abläufe im Stoffwechselgeschehen der Zellen gehorchen dieser Gesetzmäßigkeit. Eine einfache Erwärmung, so zeigte FLECKENSTEIN (18, 19), hatte im intakten Muskel eine rasche Zunahme des Ruhestoffwechsels und einen steilen Anstieg der P_{32} -Inkorporation in ATP und PCr zur Folge. Entsprechend sank bei Kühlung die Einbaugeschwindigkeit ab und erreichte bei 0°C $1/10$ bis $1/20$ des bei 20°C gemessenen Wertes. Etwa der gleiche Temperaturfaktor galt auch für die O_{18} -Aufnahme in das ATP-Molekül. Während bei 20°C innerhalb 5 min pro Molekül 62 % der O-Atome durch markierten Sauerstoff ersetzt wurden, betrug der Austausch bei 10°C 13 % und bei 0°C noch 7 %. Dies zeigt einerseits die enge Verknüpfung des Adenylphosphokreatin-Systems mit den vielfältigen, auch in Ruhe vorhandenen Zellreaktionen, andererseits wird die temperaturbedingte Verlangsamung der energiebrauchenden Vorgänge deutlich, die aber bei 0°C noch nicht zu echten Ruhebedingungen führt.

Die logische Weiterführung würde bedeuten, man senkt die Temperatur einfach so weit, bis ein vollständiger Stillstand des Stoffwechsels erreicht ist. Nun ist aber die Auskühlung von Geweben und Organen mit einer Reihe von Problemen belastet.

Die Temperaturerniedrigung führt zwar zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeiten der energetischen und enzymatischen Vorgänge in der Zelle, doch ist der Temperaturkoeffizient für die einzelnen Reaktionen nicht immer gleich. Sind die Unterschiede auch nur gering, bei einer Temperatursenkung von 20°C und mehr, kommt es zu einer erheblichen Divergenz der Geschwindigkeiten, so daß die normale Koordination der Zellvorgänge nicht mehr möglich ist. (2, 4, 30, 31, 35, 37, 43, 49). Eine Temperaturerniedrigung unterhalb des Gefrierpunktes löst durch Veränderung des Aggregatzustandes des Gewebswassers Eiskristallbildung im Gewebe aus (37, 40, 41, 48, 51). Einerseits sollen die mit großer Geschwindigkeit wachsenden stilettartigen Eiskristalle aufspießende und zerschneidende Wirkung auf den plasmatischen Feinbau ausüben (42, 61), andererseits bedingt die mit dem Gefrieren verbundene Verminderung der wässrigen Phase eine Erhöhung der Ionenkonzentration in der Restlösung des Zellsaftes, begleitet von PH-Verschiebungen und Dehydratationen, die sich fällend und denaturierend auf die lebenswichtigen Enzymsysteme auswirken (37, 40, 43). Diese Änderungen des Reaktionsmilieus sind es, die durch Verschiebungen der Enzymaktivitäten eine Disharmonie der Zellregulation zur Folge haben. Einige Prozesse wie z.B. die Triglyzeridspaltung werden bis zum Verschwinden abgestoppt, andere laufen im beschleunigten Umfang weiter ab. Bestimmte Enzyme finden gerade in der erhöhten Salzkonzentration optimale Wirkungsbedingungen. Zu diesen "osmophilen" Enzymen gehören Peroxydasen und Katalasen. Da-

neben treten auch neuartige, qualitativ abweichende Stoffwechselvorgänge auf.

Die Tiefkühlung von Zellen bzw. Zellverbänden bei Temperaturen unter 0°C setzt deshalb eine Vorbehandlung mit Schutzlösungen voraus. Wir haben als Gefrierschutzmittel ausschließlich Glycerin verwendet, weil damit bis zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen die besten Resultate erzielt worden sind. Glycerin gehört zur Gruppe der Triglyzeride. Durch seine gleichzeitige Zucker- und Alkohol-Gruppierung besitzt es ein ausgezeichnetes Permeationsvermögen in die hydrophile wie in die lipophile Phase und ist zugleich ein wirksamer Wasserbinder. Glycerin ist ein im menschlichen Organismus normalerweise vorkommender Metabolit. Der gefrierschützende Effekt beruht auf der Wirkung der beiden Komponenten: Das Kohlehydrat wirkt aufgrund des Wasserbindevermögens als Elektrolytpuffer, indem es eine rasche und zu große Dehydratation verhindert. Der alkoholisch wirksamen Komponente fällt wahrscheinlich die Aufgabe zu, den direkten Kontakt mit den Eiskristallen zu verhindern, indem sie sich beim Gefrieren als schützender Kolloidmantel um die Teilchen legt (8, 14, 37, 39, 40).

Die Vorteile des erzielten Gefrierschutzes werden allerdings zum Teil wieder eingeschränkt durch Schädigungen, die auf die Wirkung des Schutzmittels selbst zurückzuführen sind. EGDAHL und HARRIS (17) beobachteten nach der Perfusion mit 15 %igem Glycerin an der Niere tubuläre Degenerationsherde und vermuten einen direkt toxischen Effekt des Imbibitionsmittels auf die Nierentubuli.

RIVERS (56) beobachtet ähnliche Befunde und erklärt sie durch die osmotisch dehydratisierende Wirksamkeit des Glyzerins. Die Aussagekraft wird allerdings gemindert, da die Perfusion in Normothermie und Hypothermie (bis 10°C) durchgeführt und der Möglichkeit eines Anoxieschadens nicht die erforderliche Beachtung geschenkt wird. Der Energiestoffwechsel scheint primär nicht davon betroffen zu sein. Trotz dieser beschriebenen Schattenseiten der Kühlmethoden, trotz der kältebedingten Disharmonie der Stoffwechselprozesse und der lösungsbedingten Schädigungen bleibt die Forderung nach der Organkonservierung durch tiefe Unterkühlung bestehen, da diese durch Hypothermie bedingten Schäden im Vergleich mit den Beeinträchtigungen durch normotherme Anoxie ungleich geringer sind. Allein in der Hypothermie wird eine Möglichkeit zur Verlängerung der Wiederbelebenszeit und damit zur Lang- und Kurzzeitkonservierung von Geweben und Organen gesehen.

2. Die Temperaturabhängigkeit des Energiestoffwechsels

Das Energiedefizit der anoxischen Zelle ergibt sich aus der Differenz zwischen Energiebedarf und anaerober Energiebereitstellung. Der Energievorrat, der in der gesunden Zelle durch intensive Resynthesevorgänge stets aufrechterhalten wird, sinkt im Sauerstoffmangel ab. Da die Nierenzelle über eine unterstützende PCr-Fraktion nicht verfügt, geben die Veränderungen des Adenylsäuresystems Auskunft über die energetische Situation während der Belastung. Folgende Veränderungen haben sich aus unseren Untersuchungen an der extrakorporal gelager-

ten Niere in Hypothermie als charakteristisch herausgestellt: Eine erste Phase ist gekennzeichnet durch besonders ausgeprägte Verschiebungen. Durch die im akuten Sauerstoffmangel herabgesetzte Resynthese der energiereichen Phosphate bei anfänglich noch aufrechterhaltenem Funktionsstoffwechsel kommt es in der Niere zu einem massiven ATP-Abfall. Dieser war in allen unseren Versuchen nachzuweisen und ist grundsätzlich mit den Befunden an der normotherm-anoxischen Niere vergleichbar. Als wesentliches Ergebnis fand sich, daß die höhere Kühlgeschwindigkeit, d.h. das raschere Durchlaufen der stoffwechselaktiveren Temperaturbereiche den ATP-Schwund verlangsamt. Gleichzeitig mündet der Verlauf in ein höheres Energieniveau, dessen Bestand nur noch eine allmähliche Verminderung erfährt.

Die Erklärung dafür darf man in der durch die allgemeine Kühlung verursachten natürlichen Membranstabilisierung suchen, die einen entsprechend geringeren Energieaufwand zur Folge hat. Durch Hypothermie wird das gesamte Stoffwechselgeschehen gewissermaßen auf eine niedrigere Umsatzgeschwindigkeit eingestellt.

Der weitere Stoffverlauf verläuft stufenweise über das ADP und AMP bis zum Laktat in den von GERLACH und DEUTSCHE (21) aufgestellten Schritten. Auch hier ist die temperaturbedingte Verlangsamung deutlich. Bemerkenswert erscheint noch, daß im tiefen Temperaturbereich von -25°C noch ein signifikanter Abbau besteht. Wenn auch eine ATP-ase-Aktivität bis -20°C nachgewiesen wurde (54), so ist es dennoch fraglich, ob es sich hierbei um einen koordinierten Vorgang handelt, der für die

Lebenserhaltung Bedeutung hat. Es bleibt immerhin zusätzlich ein "Ausfließen" von ATP, ADP, AMP aus den durch Kälte strukturell geschädigten Zellräumen zu erwägen, dem eine unspezifische, hydrolytische Spaltung folgt. Möglicherweise liegt hierin auch die Erklärung für das Anwachsen der gesamten Nucleotide im tiefen Temperaturbereich über die Ausgangskonzentration hinaus. Ein Zusammenhang mit dem von THORN gefundenen RNS-Abbau in der anoxischen Niere wäre immerhin denkbar.

Die Veränderungen des Adenylsäuresystems sind nur ein Glied in einem ineinandergreifenden Ablauf von Zyklen. Um eine Deutung zu wagen, muß man die Milchsäurebildung in die Betrachtung einbeziehen. Die anaerobe Glykolyse ist der eigentliche Energielieferant während der ischämischen Belastung. Die Lactatzunahme ist ein direktes Maß für den Ablauf der anaeroben Glykolyse. Mit Entzug des Sauerstoffs wird die Pasteurreaktion, d.h. die hemmende Wirkung der Atmung und der sie begleitenden Phosphorylierung auf die anaerobe Glykolyse aufgehoben. Im Mittelpunkt dieser Umstellung, wenn nicht als ausschließliche Regelgröße, steht das ATP, bzw. seine für die Glykolyse als Cosubstrate notwendigen Spaltprodukte ADP und anorganisches Phosphat. Diese werden durch den Ausfall der oxydativen Phosphorylierung vermehrt und ermöglichen den gesteigerten Kohlenhydratumsatz in der Anaerobiose. Dennoch erreicht die Glykolyserate an der anoxischen und hypotherm gelagerten Niere bei stark ansteigendem Gewebsgehalt an an-organischem Phosphat und vorübergehend erhöhtem ADP nicht die erforderliche Größe. Die Cosubstrate gelangen offensichtlich nicht rasch genug

vom Ort des Energieverbrauchs, wo sie bei Zerfall des ATP entstehen, an den Ort der glykolytischen Energiebereitstellung im Plasma. Während unter aeroben Bedingungen das Angebot der gleichen Cosubstrate eine ausreichende Energieausbeute gewährleistet, ist diese kostspielige glykolytische Produktionsmethode zu keinem Zeitpunkt in der Lage, den Energiebedarf der anoxischen Zelle zu decken (9, 36).

Eine mangelnde Glykogenreserve kann dafür, wie ISSELHARD und THORN gezeigt haben, nicht verantwortlich gemacht werden. Eine glykolytische Umsatzsteigerung ist nur in Verbindung mit einer Steigerung des Energiebedarfs zu beobachten, wie die Veränderungen des Adenylsäuresystems deutlich machen. Das bedeutet, daß nicht die hohe Glykolyserate, sondern gerade die geringe Glykolyserate mit einer langsamen Abnahme der energiereichen Phosphate einhergeht. Der Energiebedarf der Zelle bestimmt die Größe der Energieentnahme pro Zeiteinheit und regelt damit auch die Geschwindigkeit des Stoffstroms.

Der Energieumsatz untersteht, wie aus unseren Befunden hervorgeht, einer gesetzmäßigen Temperaturabhängigkeit (vergleiche FLECKENSTEIN 18, 19). Der verminderte Energiebedarf führt zwar nicht zu einem Ausgleich zwischen Energieaufwand und Energiebereitstellung, aber die Zunahme des Energiedefizits erfolgt um ein Vielfaches langsamer. Eine reversible Anoxiezeit müßte sich theoretisch durch eine Erhöhung der Ausgangskonzentration an Sauerstoff und energiereichem Phosphat ebenso wie durch eine Senkung des Energiebedarfs verlängern lassen. Da aber die Zeitspanne bis zur vollkommenen Rückbildung

der unter der Anaerobiose entstandenen Funktionsänderungen von dem Ausmaß der Verschiebungen im energieverteilenden Adenylsäuresystem bestimmt wird, ist derjenigen anoxischen Überbrückungsmethode der Vorzug zu geben, die über eine größtmögliche Energiebedarfssenkung diese Änderungen am wenigsten einschränkt. Danach ist die optimale Methode die Anwendung der tiefen Hypothermie (9, 28, 29, 63).

Neben den Veränderungen im Energiehaushalt der Nierenzelle ist ein Vergleich der Redoxpotentiale des DPN-Systems als Ausdruck der allgemeinen Stoffwechsellaße von Interesse. Dabei haben sich die Relationen Pyr /Lact als empfindlicher Indikator erwiesen (26). Die Reduktion von DAP zu α -GP hat unter anaeroben Verhältnissen in der Niere nur die Bedeutung eines Nebenweges (73).

Bei Abwesenheit von Sauerstoff spiegelt sich die gesteigerte Reduktionsintensität der Gewebe in einer starken Negativierung des gemessenen RP wider. Die Berechnung gründet sich auf folgende Überlegung: In Gegenwart von LDH stehen Lactat und Pyruvat in einem Redoxgleichgewicht. Bei der Reduktion von Pyruvat zu Lactat, im Falle der Glykolyse, geht reduziertes DPNH in die oxydierte Form über. (Im Falle der Atmung wird Pyruvat irreversibel zu Acetyl-CoA oxydiert). Verfügt die Zelle nicht mehr über genügend Sauerstoff, um das beim Kohlehydratabbau auf der Stufe der Triosephosphatdehydrierung entstehende DPNH zu DPN zu oxydieren, so kommt es in der Zelle zu einer Verschiebung des DPNH / DPN-Quotienten. Die Zunahme bewirkt durch die LDH-Reaktion aufgrund der hohen Aktivität dieses Enzyms eine Zunahme des Lact./Pyruvat-Quo-

tienten. Die Hydrierung verläuft freiwillig. Sie geschieht vom Niveau des Coenzyms aus, das bedeutet: Die Kinetik der DPNH-Erzeugung ist geschwindigkeitsbestimmend. Eine Erhöhung dieses Quotienten hat dann eine Verschiebung des Effektivpotentials des Lactat / Pyruvat-Redoxsystems zu negativeren Werten zur Folge. Der Begriff des RP steht dabei in engem Zusammenhang mit der freien Energie einer Redoxreaktion.

Für die intakte Nierenparenchymzelle haben wir ein E-O (Potential gemessen bei $\text{pH}=7,0$ und $T_0 = 37^\circ\text{C}$) für das Redoxpaar Lactat durch Pyruvat von -219 mV errechnet.

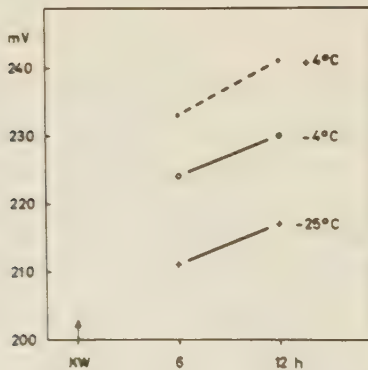


Abb. 19: Veränderungen des Redoxpotentials Lactat/Pyruvat an Kühlkonservierten Nieren nach 6- und 12-stündiger Lagerung bei $+4^\circ$, -4° und -25°C . KW: Kontrollwert.

Das Potential des Kontrollwertes liegt bei -212 mV. Eine 6-stündige Ischämie und Lagerung des Organs bei $+4^{\circ}\text{C}$ ergab eine Verschiebung zum Negativen um 11 mV. Eine 12-stündige totale Ischämie unter den gleichen Bedingungen führt zu einem Absinken um 29 mV. Dies entspricht einer freien Änderung der freien Energie des Systems um -37 Kcal.

Bei stärkerer Hypothermie (-25°C) werden die der 6-stündigen Lagerung bei -4°C analogen Werte nach 6 Tagen noch nicht erreicht.

Die von uns gemessene Verschiebung der Effektivpotentiale im Redoxstatus weist ebenfalls auf die bei Hypothermie verminderte Störung der oxydativen Prozesse an der kühlgelagerten Niere hin.

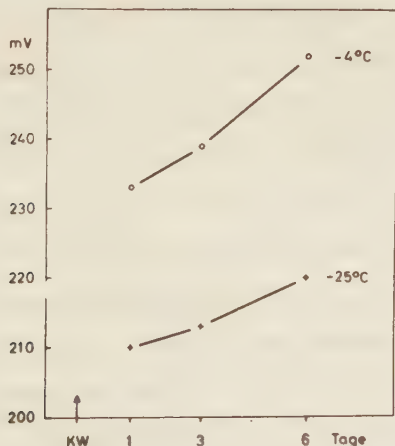


Abb. 20: Veränderungen des Redoxpotentials Lactat/Pyruvat nach Lagerung über einen Zeitraum von 1,3 und 6 Tagen bei -4° und -25°C . KW: Kontrollwert.

3. Energiestoffwechsel und Wiederbelebungszeit

Die Überlebens- und Wiederbelebungszeit eines Organs sind abhängig vom Ausmaß des unter anaeroben Bedingungen stets eintretenden Energiedefizits (9, 36, 58). Durch Verlangsamung der energieverbrauchenden Zellvorgänge ist die Hypothermie in der Lage, das reversible anoxische Intervall zu verlängern. Als Indikator des gesenkten Energiebedarfs galt uns das ATP. Dennoch ist die Festlegung einer Insuffizienzgrenze nach biochemischen Daten für die Niere nicht möglich. Einmal fehlt für ein Organ mit solch polyvalenten Funktionsleistungen das Kriterium definierter Ausfallserscheinungen. Zum andern zeigt die Höhe des vorhandenen Energiepotentials mehr das Ausmaß des Schadens als seine Natur. Andere Fragen von entscheidender Bedeutung, ob lebenswichtige Funktionen wie etwa das Multi-enzymssystem der Mitochondrien oder die an intakte Zellstruktur gebundenen Transportketten durch die Ischämie oder Kälte irreversibel geschädigt wurden, bleiben dadurch unbeantwortet (vgl. 47). Im allgemeinen gilt jedoch als Regel: Die Überlebenszeit ist umso kürzer, je höher der Energieverbrauch ist. Die Gültigkeit wird einleuchtend an den bradytrophen Geweben wie Knochen und Haut demonstriert, deren Konservierung keine größeren Probleme mehr stellt. An Organen mit hohen Stoffwechselanforderungen wie Herz und Gehirn ist die Wiederbelebungszeit streng abhängig von der Höhe der unter Anoxie aufgetretenen Energieeinbuße. Nach BRETSCHNEIDER und KÜBLER läßt das anoxische Herz sich nur dann erfolgreich wiederbeleben, wenn mindestens 40 % des ATP-Vorrats erhalten sind. Für

die Niere lässt sich allein nach den bisherigen Untersuchungen diese Minimalgröße nicht exakt aufstellen. Die biochemische Interpretation des Organzustandes stellt jedoch die Forderung nach Erhaltung einer ausreichenden Energiereserve während der Konservierung aus verschiedenen Gründen: Einmal gehen der Niere nach Einsetzen der Wiederdurchblutung alle dephosphorylierten Nucleotid-Abbauprodukte verloren. Sie treten aufgrund ihres guten Permeationsvermögens quantitativ ins Blut über. Die Niere ist also in der postischämischen Erholungsphase auf eine Neusynthese ihrer Nucleotid-Bestände angewiesen (22, 23,). Diese Restitution erfolgt außerordentlich langsam und mindert die funktionelle Wiederherstellung. Belastungen gegenüber ist die Niere dadurch lange Zeit weniger angepaßt. Zum andern bleibt der unter Anoxie eingetretene Energiefehlbetrag durch die Verkleinerung der Quotienten ATP / ADP und ADP / AMP lange erhöht. Von der Größe dieser Quotienten hängt aber die der Zelle zur Verfügung stehende, freie Energie aus der ATP-Spaltung ab. Die Arbeitsfähigkeit des Systems ist dadurch gestört, die Zelle gefährdet.

Die Frage nach dem Grenzwert der Lebensfähigkeit eines Organs nach Kühlkonservierung lässt sich allein durch die Feststellung der Wiederaufnahme von Stoffwechselvorgängen, Funktion und Regeneration, beantworten.

Untersuchungen über die Wiederbelebung der Niere nach starker Ischämie (THORN 1961/62) erbrachten einen überraschenden Befund. Obwohl die Niere als Organ mit vielseitigen Stoff-

wechselleistungen über eine hohe Aktivität der Atmungskette und des Enzymsystems verfügt, obwohl der Sauerstoffverbrauch den aller anderen Organe übertrifft, weist die Niere im absoluten O_2 -Mangel eine erhebliche Resistenz auf. Selbst nach Abklemmzeiten von 2-3 Stunden Dauer erholen sich Stoffwechsel und Nierenfunktion relativ rasch. Diese Zusammenhänge werden dann verständlich, wenn man beachtet, daß von dem gesamten Energieaufkommen der Niere nur ein verschwindend kleiner Teil auf den zellulären Erhaltungs- und Strukturumsatz entfällt. Der Löwenanteil (95 %) wird für den Funktionsumsatz bereitgestellt. Nach Unterbrechung der Durchblutung kommt in der Niere im Gegensatz zu Herz und Gehirn der gesamte funktionelle Stoffwechsel zum Erliegen. Die Niere verharret dann in einem weitgehend unveränderten Zustand. Einerseits ist die Basisenergie, um eine vita minima zu decken, gering, andererseits vermag die Niere dank ihres Regenerationsvermögens nach einer solchen Belastung alle nekrotischen Tubulusepithelien unter Wahrung des tubulären Bauplans zu erneuern (THORN 1963). Aus dieser Sicht sind die Aspekte für eine Langzeitkonservierung der Niere durch Anwendung der tiefen Hypothermie ermutigend.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

1. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, durch die Bestimmung der Metabolitkonzentrationen des Adenylsäuresystems und der anaeroben Glykolyse Einblicke zu gewinnen in den Ener-

giestoffwechsel der Niere in Hypothermie unter variierten Bedingungen der Kühltemperatur und Lagerdauer.

2. Um eine rasche und homogene Auskühlung in stoffwechsel-ärmere Temperaturbereiche zu erzielen, erwies sich die blutfreie Perfusion der Niere am wirksamsten. Sie bietet weiterhin die Möglichkeit, dem Organ gefrierschützende Substanzen zuzuführen.

3. Versuche mit variiertem Kühlgeschwindigkeit zeigten eine klare Abhängigkeit zwischen Metabolitgehalt und erreichter Endtemperatur. Die rasche Stoffwechselsenkung bietet die energetisch günstigsten Ausgangsbedingungen.

4. Die Veränderungen im Stoffwechselstatus der kühlgelagerter Niere entsprechen dem Grundsystem, das am ischämischen Organ in Normothermie gewonnen wurde. Die Metabolitverschiebungen sind jedoch infolge des geringeren Energieverbrauchs zeitlich stark auseinandergezogen.

5. Sowohl der aerobe wie der anaerobe Energiestoffwechsel gehorchen einer Temperaturabhängigkeit. Trotz der hypothermiebedingten Stoffwechselverlangsamung bleibt die unzureichende Koppelung zwischen Energieentnahme und Energiebereitstellung während der Anaerobiose bestehen. Sie findet ihr biochemisches Korrelat in der Abnahme an ATP. Die Erschöpfung ist umso größer, je stärker die Energieentnahme ist.

6. Wenn das Ausmaß der Veränderungen im Energiestoffwechsel eine Bewertung erlaubt, so ist derjenigen Konservierungsmethode der Vorzug zu geben, die den Energiebedarf am weitesten zu senken imstande ist, denn so werden die günstigsten Ausgangsbedingungen geschaffen für eine anschließende Erholung.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1) ANDJUS, R.K.; V.Rajeoski

Resumption of heart beats after thawing from
-196°C (experimentson isolated frog hearts).
Proc. 10th Intern. Congr.Refrigeration, Copen-
hagen, Oxford: Pergamon Pr.1960, P. 632

2) ANDREW, C.; L.Bassett

Tissue banks. Aspects théor. et industr. de
la lyoph. Ed.L.Rey
Hermann, Paris, 431, 1964

3) BECQUEREL, P.

La suspension de la vie des spores des bacté-
ries et des moisissures desséchées dans le
vide vers le zéro absolu. Ses conséquences
pour la dissémination et la conservation.
Compt. rend. 231, 1392, 1950

4) BECKETT, L.G.

The effects of residual moisture in frozen-
dried materials, and its measurement. In: Biol.
Appl. of Freez.a.Drying. Ed. by R.J.C.Harris
N.Y.Acad.Press, 285, 1954

5) BELTRAN, I.C.; H.T.Blumenthal

Effects of dehydration-freezing-thawing on the
preservation and homotransplantability of re-
nal tissue.J.Urol, 82, 4: 424, October 1959

6) BICKFORD, R.G.; Fr. Winton

The influence of temperature on the isolated
kidney of the dog.
J.Physiol. 89, 198, 1937

7) BILLINGHAM, R.E.

The preservation of tissues. In:
Biol.Appl. of Freez. a. Drying.
Ed.by R.J.I.Harris, N.Y.Acad.Press, 253, 1954

- 8) BLOCH, J.H., J.K.Longerbeam, W.G.Manax, S.Hilal, R.C.
Lillehei.Preservative solutions for freezing
whole organs in vitro.
Trans.Amer.Soc.Art.Int.Organs 9, 139, 1963
- 9) BRETSCHNEIDER, H.J.
Überlebenszeit und Wiederbelebungszeit des
Herzens bei Normo- und Hypothermie.
Verb.Dtsch.Ges. Kreislaufforsch. 30, 11, 1964
- 10) BUSCH, E.W.; H.Scheitza; W. Thorn
RNS-Gehalt in Gehirn, Leber und Niere nach
ischämischer oder anoxischer Belastung.
Naturw. 23, 545, 1962
- 11) CALNE, R.; D.Pegg; J.Pryse-Davies; F.Brown
Renal preservation by ice-cooling.
Brit. Med. J. 645, 5358, 1963
- 12) CALNE, R.Y.
Technical aspects of cadaveric renal trans-
plantation.
Brit. J. of Urol. 37, 3: 285, June 1965
- 13) CLEVELAND, R.J.; H.M.Lee; G.R.Pront; D.M. Hume
Preservation on the cadaver kidney for renal
homotransplantation in man.
Surg. Gynec. Obstet. 119: 991, 1964
- 14) CONNAUGHTON, P.J.; F.J. Lewis
Use of glycerol and chloroform in heart pre-
servation by freezing.
Surg. Forum 12, 177, 1961
- 15) DESHPANDE, P.J.; St.W.Jacob
Successfull storage of kidneys at subzero
temperatures.
Surg. Forum, 14: 176, 1963

- 16) DUNEA, G.; S.Nakamoto; R.A.Straffon; J.E.Figuerva; A.A. Versaci; M.Shibagaki; W.J.Kolff
Renal homotransplantation in 24 patients.
Brit. Med. J., 1: 7, 1965
- 17) EGDAHL, R.; Harris, R.
In vivo tolerance of canine kidneys to
glycerol perfusion.
Transplantation Bulletin 6, 110, 1959
- 18) FLECKENSTEIN, A.; J.Janke
Der Austausch von radioakt. ^{32}P -markiert
Orthoph. mit den P α , P β und P γ von ATP.
Pflügers Arch. 265, S.237-63, 1957
- 19) FLECKENSTEIN, A.; E.Gerlach; J.Janke; P.Marnier
Die Inkorporation von markiertem Sauer-
stoff aus Wasser in die ATP-Kreatinphos-
phat- und Orthophosphat-Fraktion intakter
Muskeln bei Ruhe, tetanischer Reizung und
Erholung.
Pflüg. Arch. 271, 75-104, 1960
- 20) GERLACH, E.; H.J.Döring; A.Fleckenstein
Papierchromatische Studien über die Adenin-
Guanin-Nucleotide sowie andere säurelös-
liche Phosphorverbindungen des Gehirns bei
Narkose, Ischämie und in der Abhängigkeit
von der Technik der Gewebsentnahme.
Pflüg. Arch. 266: 266, 1958
- 21) GERLACH, E.; W.Bader; W.Schwoerer
Über den Stoffwechsel säurelöslicher Phos-
phorverbindungen in der Rattenniere.
Pflüg. Arch. 272, 407, 1961

- 22) GERLACH, E.; B.Deuticke; R.H.Dreisbach
Zum Verhalten von Nucleotiden und ihren
dephosphorylierten Abbauprodukten in der
Niere bei Ischämie und kurzzeitiger post-
ischämischer Wiederdurchblutung.
Pflüg. Arch. 278, S. 296, 1963
- 23) GERLACH, E.; B.Deuticke; R.H.Dreisbach
Stoffwechsel von Adenin-Nucleotiden in
Nierenschnitten unter verschiedenen expe-
rimentellen Bedingungen und während post-
anoxischer Erholung.
Pflüg. Arch. 284, 213-223, 1965
- 24) HAYNES, L.; L.Tullis, H.M.Pyhe, M.T.Sproul, S.Wallach
Clinical me of glycerolized frozen blood.
J.Am. Med. Ass. 173 : 1657, 1960
- 25) HOFFMANN, A.
Extrakorporal renal storage
Invest.Urol. 2: 567-73, 1965
- 26) HOHORST, H.J.; F.H.Kreutz; Th.Bücher
Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzent-
rationen in der Leber der Ratte.
Biochem. Z.332: 18, 1959
- 27) HUMPHRIES, Al.
Hypothermic perfusion of the canine kid-
ney for 48 hours followed by reimplantation
Amer. Surg. 30: 748-52, 1964
- 28) ISSELHARD, W.; H.Merguet
Metabolite des Glycolyse-Cyclus und des
Adenylsäure-Phospho-kreatinsystems im
schlagenden und durchbluteten Warmblutherze
unter verschiedenen Versuchsbedingungen.
Pflüg. Arch. 276, 211, 1962

- 29) ISSELHARD, W.; H.Merguet, J.Aengenvoort
Vergleich des Herzstoffwechsels bei verschiedenen Methoden des künstlichen Herzstillstandes.
Pflüg. Arch. 286, 336, 1965
- 30) JOSLYN, M.A.
The action of enzymes in the dried state and in concentrated solution.
Proc. 8th Intern. Congr. Invest. 7, 1: 19
- 31) KAROW, A.M.; W.R.Webb
Principles and problems of hypothermic organ preservation.
Surg. Gyn. Obstet. 609, 1964
- 32) KRAMER, K.
Die Stellung der Niere im Gesamtkreislauf.
Verh.deutsch.Ges.Inn.Med., 65.Kongr.3, 225
1959
- 33) KRAMER, K.; K.Thurau; P.Deetjen
Hämodynamik I. Mitteilung
Pflüg. Arch. 270, 251, 1960
- 34) KRAMER, K.; P.Deetjen
Beziehungen des O_2 -Verbrauchs der Niere zu Durchblutung und Glomerulusfiltrat bei Änderung des art. Druckes.
Pflüg. Arch. 271, 782, 1960
- 35) KUBANYI, E.
Theoretische Grundlagen der Tiefkühlung.
Zentralbl. Chir., Heft 47, S. 2175, 1958
- 36) KÜBLER, W.
Geschwindigkeit der anaeroben Glycolyse des Herzens in Abhängigkeit von Milchsäurekonzentrationen, ATP-Gehalt und Temperatur.
Verh.deutsch.Ges.Kreislaufforschg., 30.Tag, S. 211, 1964

37) KÜHNAU,

Ernährungsphysiologische Gesichtspunkte
bei der Verwendung von Gefrierprodukten.
Wissenschaftl. Veröffentl.d.Deutsch.Ges.
f.Ernährung, 12: 1, 1964

38) LEVY, M.N.

Oxygen consumption and blood flow in the
hypothermic perfused kidney.
Amer. J.Physiol. 197, 1111, 1959

39) LOVELOCK, J.E.

Mechanism of protective action of glycerol
against hemolysis by freezing and thawing.
Biochem. Biophysica Acta 10, 414, 1953

40) LOVELOCK, J.E.

Denaturation of liquid-protein complexes
as a cause of damage by freezing.
Proc.Roy.Soc.Ser. B. 147, 427, 1957

41) LUSENA, C.V.

Ice propagation in glycerol solutions at
temperatures below -40°C .
Ann. of the N.Y. Acad. of Sciences, 85,
2: 541, 1960

42) LUYET, B.J.

Sur le mécanisme de la mort cellulaire
par les hautes pressions, l'intensité et
la durée des pressions léthales pour la
levure.
Compt. rend. 204, 1214, 1937

43) LUYET, B.J.

Life and death at low temperatures:
Normandie, Biodynamica 1940

44) LUYET, B.J.

On various phase transitions occurring in aqueous solutions at low temperatures.
Ann. of the N.Y. Acad. of Science,
85, 2: 549, 1960

45) MANAX, W.G.

Organperfusion before transplantation with particular reference to the kidney.
Surgery, 57, 528-34, 1965

46) MANAX, W.G.

J.H.Bloch; J.K.Longerbeam; R.C.Lillehei
Successful 24 hours in vitro preservation of canine kidneys by the combined use of hyperbaric oxygenation and hypothermia.
Surgery 56, 175, 1964

47) MATTENHEIMER, H.; V.E.Pollok; R.C.Mucke, R.M.Kak

Quantitative Enzymverteilungsmethode im Nephron.
Verh. Deutsch. Ges. Inn. Med. 70, 579, 1964

48) MERYMAN, H.T.

Physical limitations of the rapid freezing method.
Proc.Roy.Soc.Ser. B. 147: 452, 1957

49) MERYMAN, H.T.

Tissue freezing and local cold injury.
Physiol. Rev. 37: 233, 1957

50) MERYMAN, H.T.

Mechanics of freezing in living cells and tissues.
Science 124, 515, 1965

51) MERYMAN, H.T.

General principle of freezing injury in cellular materials.

Amer. N.Y. Acad. Science 85, 503, 1960

52) MORAN, T.

Critical temperature of freezing and living muscle.

Proc. Roy. Soc. Ser.B. 107, 182, 1929/30

53) OPITZ, E.; W.Rotter; W.Hilscher

Über die Wiederbelebenszeit der Ratten-
niere.

Dtsch. Ges. Pathol. 37, 336, 1954

54) PARTMANN, W.

Aktivierung der ATP-Spaltung in Warm- und Kaltblütermuskel durch Gefrieren und mechanische Verletzung.

Z. Ernährungswiss. Bd. 2, S. 70, 1961

55) FAUSESCU, E.; V.Beroniade; A.Plesoionu

L'activité enzymatique du rein perfusé à basses températures.

Rev. Roum.de physiol. 1, 297, 1964

56) RIVERS, R.J.jr.; B.Cady; H.Barner; L.L.Haynes

Osmotic cell damage during glycerol perfusions of the isolated canine kidney.

Surg. Forum, 12, 134, 1961

57) SCHMIDT-MENDE, M.

Die Konservierbarkeit der Niere in Hypothermie.

Habilitationsschr., Chir.Univ.Klinik, München, 1965

- 58) SCHNEIDER, M.
Über die Wiederbelebung nach Kreislaufunterbrechung.
Thoraxchir. 6, 95, 1958
- 59) SIEKEVITZ, P.
Oxydative Phosphorylation in muscle mitochondria and its possible regulation.
Am. N.Y. Acad. Science 72, 500, 1958/59
- 60) SLOVITER, H.A.
Effects of the intravenous administration of glycerol solutions to animals and man.
J.Clin. Invest. 619, 1958
- 61) SMITH, A.N.
Effects of low temperature on living cells and tissues. Biological Applications of freezing and drying.
Ed. Harris, R.J.C. N.Y. Acad. Pr. 432, 1957
- 62) SÖLLING, H.; L.Schmidt
Vergleichende Untersuchungen des Sauerstoffverbrauchs und der Bearbeitung von Glycose, Milchsäure und Benz-Traubensäure im Stoffwechsel der Hundeniere.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Exp.Path. 240, 140, 1950
- 63) THAUER, R.; W.Brendel
Hypothermie.
Progr. Surg. 2, 73 (Karger Basel/N.York) 1962
- 64) THORN, W.; G.Pfleiderer; R.A.Frowein; J.Ross
Stoffwechselforgänge im Gehirn bei akuter Anoxie, akuter Ischämie und in der Erholung.
Pflüg. Arch. 261, 334, 1955

- 65) THORN, W.; J.Heimann; B.Müldener; G.Gercken
Beitrag zum Stoffwechsel von Leber, Niere,
Herz und Skelettmuskulatur in Asphyxie, Anoxie
und bei Hypothermie.
Pflüg. Arch. 265, 34, 1957
- 66) THORN, W.; W.Isselhard; B.Müldener
Glykogen, Glucose und Milchsäure-Gehalt in
Warmblüterorganen bei unterschiedlicher ver-
suchsanordnung und anoxischer Belastung, mit
Hilfe optischer Fermentteste ermittelt.
Biochem. Z. 331, 545, 1959
- 67) THORN, W.;
Ox.Phosphorylierung, KH-Gehalt und PAH-Clearence
in der Niere nach Ischämie und in der Erholung.
1.Symp. Ges. Nephrol. 91, 1961
- 68) THORN, W.; F.Liemann
Metabolitkonzentrationen in der Niere und
PAH-Clearence nach akuter Ischämie und in der
Erholung nach Ischämie.
Pflüg. Arch. 273, 528, 1961
- 69) THORN, W.; G.Jacobs; H.Lapp; P.V.Wichert
Metabolische und histologische Veränderungen
in Nieren nach 2 oder 3 Stunden Ischämie und
Wiederdurchblutungszeiten bis zu 20 Tagen.
Pflüg. Arch. 276, 1, 1962
- 70) THORN, W.; E.W.Busch
RNS- und Metabolitgehalt in Warmblüterorganen
nach unterschiedlicher akuter oder chronischer
Belastung.
Biochem. Z. 339, 112, 1963
- 71) TRUSS, F.
Ischämie kranker Nieren und lokaler Stoffwech-
seldämpfung.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 296, 227, 1960

72) ULLRICH, K.J.

Über das Vorkommen von Phosphorverbindungen
in verschiedenen Nierenabschnitten und
Änderung ihrer Konzentrationen in Abhängigkeit
vom Diurese-Zustand.

Pflüg. Arch. 262, 551, 1956

73) WICHERT, v.P.

Enzymatische Bestimmung von L- α -Glycerophosphat
in normalen und belasteten Warmblüterorganen.

Biochem. Z. 336, 49-55, 1962

Lebenslauf

Am 17. Februar 1940 wurde ich als Sohn des Pfarrers Hugo Fuchs geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in St. Julian, einem kleinen Dorf in der Pfalz, wo ich die Volksschule besuchte. Leider ist mein Vater aus dem Krieg nicht mehr zurückgekehrt, er ist in Rumänien gefallen. Wir zogen deshalb um der Schule willen nach Zweibrücken. Hier besuchte ich das altsprachliche Gymnasium und machte im März 1959 Abitur. In den folgenden 18 Monaten leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Nach einem Philologie-Semester wandte ich mich der Medizin zu. Die fünf vorklinischen und fünf klinischen Semester war ich Student der Münchner Universität. Ein Semester habe ich in Genf studiert. Im Winter 1967 habe ich in München das medizinische Staatsexamen abgelegt.

Herrn Prof. Dr. W. Brendel danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes an seinem Institut und für wertvolle Hinweise und Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Do. Dr. M. Schmidt-Mende für die hilfreiche Einführung in die experimentelle Arbeit und für fachliche Unterstützung und menschliche Anteilnahme.

Für zuverlässige Hilfe beim Auswerten der Ergebnisse und technische Assistenz möchte ich Frau E. Denkert und Fräulein U. Seuffert herzlichen Dank aussprechen.

Nicht zuletzt danke ich meinem Kommilitonen Herrn N. Mender für seine Mitarbeit an den Versuchen.

